



22 JUIN 2000

REC'D 23 AUG 2000

WIPO

PCT

FR 00/1723

4

# BREVET D'INVENTION

CERTIFICAT D'UTILITÉ - CERTIFICAT D'ADDITION

## COPIE OFFICIELLE

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

Fait à Paris, le

21 JUIN 2000

Pour le Directeur général de l'Institut  
national de la propriété industrielle  
Le Chef du Département des brevets

**PRIORITY DOCUMENT**  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH  
RULE 17.1(a) OR (b)

Martine PLANCHE

INSTITUT  
NATIONAL DE  
LA PROPRIÉTÉ  
INDUSTRIELLE

SIEGE  
26 bis, rue de Saint Petersburg  
75800 PARIS Cedex 08  
Téléphone 01 53 04 53 04  
Télécopie 01 42 93 59 30



# BREVET D'INVENTION, CERTIFICAT D'UTILITÉ

Code de la propriété intellectuelle-Livre VI



N° 55-1328

## REQUÊTE EN DÉLIVRANCE

26 bis, rue de Saint Pétersbourg  
75800 Paris Cedex 08  
Téléphone : 01 53 04 53 04 Télécopie : 01 42 93 59 30

Confirmation d'un dépôt par télécopie ☐

Cet imprimé est à remplir à l'encre noire en lettres capitales

Réservé à l'INPI

DATE DE REMISE DES PIÈCES **21 JUIN 1999**  
N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL **9907831**  
DÉPARTEMENT DE DÉPÔT **75** **75 INPI PARIS**  
DATE DE DÉPÔT **21 JUIN 1999**

1 NOM ET ADRESSE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE  
À QUI LA CORRESPONDANCE DOIT ÊTRE ADRESSÉE

Cabinet ARMENGAUD AÎNÉ  
3, Avenue Bugeaud  
75116 PARIS

### 2 DEMANDE Nature du titre de propriété industrielle

☒ brevet d'invention ☐ demande divisionnaire  
☐ certificat d'utilité ☐ transformation d'une demande de brevet européen

☐ demande initiale  
☐ brevet d'invention

n° du pouvoir permanent références du correspondant téléphone  
**D.59782** **01-45-53-05-50**

### Établissement du rapport de recherche

☐ différé ☒ immédiat

Le demandeur, personne physique, requiert le paiement échelonné de la redevance ☐ oui ☒ non

Titre de l'invention (200 caractères maximum)

"Moyens pour l'identification du locus d'un gène majeur de la résistance au virus de la panachure jaune du riz et leurs applications".

### 3 DEMANDEUR (S) n° SIREN code APE/NAF

Nom et prénoms (souligner le nom patronymique) ou dénomination

INSTITUT DE RECHERCHE POUR LE DÉVELOPPEMENT (I.R.D.)

Forme juridique

Nationalité (s) Française

Adresse (s) complète (s)

213 Rue La Fayette  
75480 PARIS CEDEX 10

Pays

FRANCE

### 4 INVENTEUR (S) Les inventeurs sont les demandeurs ☐ oui ☒ non Si la réponse est non, fournir une désignation séparée

En cas d'insuffisance de place, poursuivre sur papier libre ☐

### 5 RÉDUCTION DU TAUX DES REDEVANCES ☐ requise pour la 1ère fois ☐ requise antérieurement au dépôt : joindre copie de la décision d'admission

### 6 DÉCLARATION DE PRIORITÉ OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE LA DATE DE DÉPÔT D'UNE DEMANDE ANTÉRIEURE

pays d'origine

numéro

date de dépôt

nature de la demande

### 7 DIVISIONS antérieures à la présente demande n° date n° date

### 8 SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE

(nom et qualité du signataire)

Mandataire : Chantal PEAUCELLE  
n° 92-1189

SIGNATURE DU PRÉPOSÉ À LA RÉCEPTION SIGNATURE APRÈS ENREGISTREMENT DE LA DEMANDE À L'INPI

# DOCUMENT COMPORTANT DES MODIFICATIONS

PAGE(S) DE LA DESCRIPTION OU DES REVENDEICATIONS OU PLANCHE(S) DE DESSIN			R.M.*	DATE DE LA CORRESPONDANCE	TAMPON DATEUR DU CORRECTEUR
Modifiée(s)	Supprimée(s)	Ajoutée(s)			
p 8				13/12/99	J P M - 16 DEC. 1999
p 19 à 39	p 40 à 46			20/4/2000	J P M - 22 MAI 2000

Un changement apporté à la rédaction des revendications d'origine, sauf si celui-ci découle des dispositions de l'article R.612-36 du code de la Propriété Intellectuelle, est signalé par la mention «R.M.» (revendications modifiées).

Moyens pour l'identification du locus d'un gène majeur de la résistance au virus de la panachure jaune du riz et leurs applications.

5 L'invention a pour objet des moyens, outils et procédés, pour l'identification du locus d'un gène majeur de résistance au virus de la panachure jaune du riz (en abrégé RYMV pour Rice Yellow Mottle Virus). Elle vise plus spécialement, en tant qu'outils, des marqueurs et des amorces PCR et leurs applications à l'établissement  
10 de la cartographie physique de la résistance et au clonage du gène.

RYMV est un virus endémique en Afrique. Chez quelques rares variétés de l'espèce africaine de riz cultivé *Oryza glaberrima*, une résistance très élevée au  
15 RYMV a été identifiée. Mais comme les hybrides interspécifiques entre les deux espèces de riz cultivées sont extrêmement stériles, les recherches antérieures n'ont pas permis de décrire ni de bases génétiques, ni de mécanisme de cette résistance.

20 Les travaux des inventeurs dans ce domaine ont montré qu'une variété dénommée *Gigante*, originaire du Mozambique et identifiée par l'ADRAO, de l'espèce asiatique de riz cultivé *Oryza sativa*, manifestait les mêmes caractéristiques que celles observées chez *O. glaberrima*.  
25 Les inventeurs ont caractérisé la résistance à RYMV en mettant en évidence qu'elle est liée à un gène

majeur de résistance récessif et identique chez les deux sources de résistance considérée (*O. Sativa* et *O. glaberrima*).

5 Cette résistance intervient au niveau du mouvement de cellule à cellule et se traduit par un blocage du virus au niveau des cellules infectées alors que la réplication du virus est normale. La migration du RYMV se fait sous forme d'un complexe nucléoprotéique associant acide nucléique viral, protéine de la capsid  
10 et protéine de mouvement du virus. Chez la plante, un facteur cellulaire, probablement une protéine, contribue également au déplacement du virus dans les cellules des variétés sensibles. Chez les variétés résistantes au contraire, une mutation de cette protéine ne permet plus  
15 l'association avec le virus et donc sa diffusion dans la plante.

Compte tenu de ces résultats, les inventeurs ont élaboré une méthode et des outils spécifiques pour identifier ce gène de résistance au RYMV qui code pour  
20 cette protéine permettant d'assurer le mouvement du virus dans la plante.

L'invention a donc pour but de fournir un procédé pour l'identification de marqueurs moléculaires du locus de résistance au RYMV.

25 Elle vise également, en tant que tels, les fragments d'ADN tels que révélés par ce procédé, et utilisables en tant que marqueurs.

L'invention vise en outre les applications de tels marqueurs, notamment pour définir d'autres marqueurs de haute spécificité vis-à-vis du locus de résistance et pour prédire un phénotype résistant.

5 L'invention vise tout particulièrement l'application desdits marqueurs pour établir la cartographie physique de la résistance et pour le clonage du gène.

10 L'invention vise encore, en tant que nouveaux produits, les séquences des amorces utilisées dans les techniques PCR mises en oeuvre.

Conformément à l'invention, l'identification de marqueurs du locus d'un gène majeur de résistance à YMV, comprend l'utilisation de marqueurs AFLP (Amplified  
15 Fragments Length Polymorphism) et fait appel à la technique PCR.

Ce procédé d'identification est caractérisé en ce qu'il comprend

20 - l'amplification sélective de fragments d'ADN de riz d'une part d'individus résistants, d'autre part d'individus sensibles, descendant de variétés parentales, ces fragments ayant été préalablement soumis à une étape de digestion, puis de ligation pour fixer des adaptateurs complémentaires d'amorces ayant, à leur extrémité, un ou

plusieurs nucléotides spécifiques, l'une des amorces du couple étant marquée aux fins de révélation,

5 - la séparation des produits d'amplification, par électrophorèse sur gel dans des conditions dénaturantes, et

10 - la comparaison des profils d'électrophorèse obtenus avec des mélanges de fragments issus de descendants résistants et des mélanges issus de descendants sensibles, avec les fragments provenant des variétés parentales, aux fins d'identification de bandes dont le polymorphisme est génétiquement lié au locus de résistance, cette identification étant suivie le cas échéant, à titre de validation, d'une vérification sur  
15 chacun des individus et du calcul du taux de recombinaison génétique entre le marqueur et le locus de résistance.

Dans un mode de réalisation de l'invention, les fragments d'ADN sont obtenus par digestion des ADN génomiques de plantes résistantes d'une part, et de  
20 plantes sensibles d'autre part, et de leurs parents, à l'aide d'enzymes de restriction.

Des enzymes de restriction qui se sont révélées appropriées comprennent EcoRI et MseI.

25 De courtes séquences nucléotidiques sont fixées aux fragments de digestion (adaptateurs) pour générer des

extrémités franches auxquelles sont ensuite fixés des adaptateurs.

Les amorces utilisées dans l'étape d'amplification sont complémentaires de ces adaptateurs avec, à leur extrémité 3', de 1 à 3 nucléotides qui peuvent être variables.

L'étape d'amplification est conduite avantageusement selon la technique PCR.

Des profils d'amplification spécifiques sont obtenus avec des couples d'amorces possédant à leur extrémité, respectivement, des motifs AAC et CAG, ACC et CAG, ou encore AGC et CAG.

Les séquences correspondant aux adaptateurs EcoRI et MseI sont respectivement GAC TGC GTA CCA ATT C (SEQ ID N°1) et GAT GAG TCC TGA GTA A (SEQ ID N° 2).

Les couples d'amorces mis en oeuvre pour l'amplification sont alors avantageusement choisis parmi E-AAC/M-CAG ; E-ACC/M-CAG ; et E-AGC/M-CAG ; dans lesquels E et M correspondent respectivement à SEQ ID N° 1 et SEQ ID N°2.

L'étude comparative des profils d'amplification obtenus permet de révéler des bandes polymorphes spécifiquement présentes chez les variétés sensibles et leurs descendants sensibles, comme exposé dans les



exemples, et correspondant en conséquence à des marqueurs de résistance.

5 En particulier, la révélation sur gel d'électrophorèse en conditions dénaturantes conduit à l'identification de 2 bandes marqueurs M1 et M2 respectivement de 510 pb et 140 pb.

10 Ces 2 bandes déterminent, d'après l'analyse des données de ségrégation, un segment chromosomique de 10 à 15 cM portant le locus de résistance et sont situées de part et d'autre de ce locus, à 5-10 cM.

15 Selon une disposition du procédé de l'invention, les bandes polymorphes identifiées en tant que marqueurs spécifiques du locus de la résistance au RYMV sont isolées à partir des gels. On opère avantageusement par excision des gels d'électrophorèse. Cette étape d'isolement est suivie d'une purification en procédant selon les techniques classiques. On dispose ainsi de fragments d'ADN.

20 Selon une autre disposition de l'invention, lesdits fragments purifiés sont clonés dans un vecteur approprié, tel qu'un plasmide, introduit dans des cellules hôtes, notamment des cellules bactériennes comme celles de *E. coli*.

25 Selon encore une autre disposition de l'invention, les fragments d'ADN purifiés et clonés sont séquencés.

Mettant à profit les séquences des inserts correspondant auxdits fragments d'ADN, l'invention

fournit également un procédé d'obtention de marqueurs de grande spécificité vis-à-vis du locus d'un gène majeur de résistance au RYMV. Ce procédé est caractérisé en ce qu'on définit des couples d'amorces PCR complémentaires de fragments de la séquence d'un insert donné, on procède à une amplification spécifique de l'insert à l'aide de ces couples d'amorces, puis on soumet les produits d'amplification à une migration sur gel d'électrophorèse.

Ces séquences d'ADN sont utilisables pour identifier un polymorphisme lié au locus de résistance dans une variété de riz à étudier suivant différents procédés, ainsi que décrit dans les exemples :

1) en identifiant directement un polymorphisme de taille de ces séquences d'ADN après amplification spécifique et séparation des fragments sur gel d'agarose,

2) en digérant les produits d'amplification par des enzymes de restriction pour séparer les produits de digestion sur gel d'agarose,

3) en utilisant ces séquences comme des sondes pour hybrider l'ADN de variétés de riz préalablement digérées par une enzyme de restriction et déterminer un polymorphisme de restriction.

L'invention vise, en tant que nouveaux produits, les bandes AFLP polymorphes telles qu'identifiées par le procédé défini ci-dessus, à partir

d'ADN de plantes de riz, et le cas échéant isolées, purifiées et séquencées.

5 Ces bandes AFLP sont caractérisées en ce qu'elles sont spécifiquement mises en évidence dans une variété sensible au RYMV (IR64) et dans la fraction de plantes sensibles issues du croisement de cette variété avec la variété résistance Gigante comme décrit dans les exemples.

10

L'invention vise tout spécialement les séquences d'ADN correspondant à ces bandes polymorphes, et qui permettent de définir un segment du chromosome 4 de 10-15 cM portant le locus de résistance au RYMV.

15

Compte tenu de leur procédé d'obtention, les bandes AFLP correspondent à des fragments de restriction et en particulier, conformément à un mode de réalisation du procédé de l'invention, à des fragments EcoRI - MseI.

20

Des fragments de ce type sont appelés marqueurs M1 et M2 et sont caractérisés par une taille, respectivement, de 510 pb et de 140 pb en gel d'électrophorèse en conditions dénaturantes.

25

Ces fragments sont caractérisés en ce qu'ils correspondent à des séquences d'ADN flanquant le locus de résistance et situés de part et d'autre de ce dernier à 5-10 cM.

L'invention vise également des fragments clonés dans des vecteurs tels que plasmides, ces vecteurs de clonage en tant que tels, caractérisés par le fait qu'ils comportent de tels fragments, et les cellules hôtes transformées à l'aide de ces vecteurs, tels que des cellules bactériennes comme *E. coli*. L'invention vise notamment la séquence d'ADN correspondant au fragment identifié comme marqueur M1 et répondant à la séquence SEQ ID N° 3 suivante :

CGTGCTTGCTTATAGCACTACAGGAGAAGGAAGGGGAACACAACAGCCATGGCGAGC  
 GAAGGTTCAACGTCGGAGAAAACAGGCTGCGACGGGCAGCAAGGTGCCGGCGGCGGAT  
 CGGAGGAAGGAAAAGGAGGAAATCGAAGTTATGCTGGAGGGGCTTGACCTAAGGGCA  
 15 GATGAGGAGGAGGATGTGGAATTGGAGGAAGATCTAGAGGAGCTTGAGGCAGATGCA  
 AGATGGCTAGCCCTAGCCACAGTTCATACGAAGCGATCGTTTAGTCAAGGGGCTTTC  
 TTTGGGAGTATGCGCTCAGCATGGAAGTGCAGAAAGAAGTAGATTTAGAGCAATG  
 AAAGACAATCTGTTCTCGATCCAATTCAATTGTTTGGGGGATTGGGAACGAGTTATG  
 AATGAAGGTCCATGGACCTTTCGAGGATGTTCCGGTGCTCCTCGCAGAATATGATGGC  
 20 TGGTCCAAGATTGAAT

La séquence d'ADN du marqueur M1 présente une taille de 471 pb.

L'invention vise encore, en tant que nouveaux produits, les séquences de nucléotides utilisées comme amorces d'amplification en PCR.

De telles amorces comprennent les couples  
 30 E-AAC/M-CAG ; E-ACC/M-CAG ; E-ACC/M-CAG ; dans lesquels E

et M correspondent respectivement à SEQ ID N° 1 et SEQ ID N° 2.

D'autres amorces encore sont complémentaires de séquences identifiées dans la séquence du fragment désigné par marqueur M1. Il s'agit en particulier de séquences (5', 3') choisies parmi :

10 AGGAAGGGGAACACAACAGCC (21 pb) (SEQ ID N° 4)  
TTATGCTGGAGGGGCTTGACC (21 pb) (SEQ ID N° 5)  
GCAGTTCCATGCTGAGCGCAT (21 pb) (SEQ ID N° 6)  
15 CCGAACATCCTCGAAAGGTCC (21 pb) (SEQ ID N° 7)  
TCATATTCTGCGAGGAGCACC (21 pb) (SEQ ID N° 8)

Selon encore un autre aspect, l'invention vise l'utilisation des séquences d'ADN obtenues avec les amorces ci-dessus pour définir des polymorphismes permettant l'identification de phénotypes résistants.

L'invention concerne également un procédé d'identification de la séquence d'ADN portant le gène majeur de la résistance au RYMV. Ce procédé est caractérisé par le criblage d'une banque constituée de fragments d'ADN de 100 à 150 kb de la variété IR64 ou autre, telle que la banque BAC (Bacterial Artificial Chromosomes), clonés dans des bactéries, pour sélectionner le ou les clones de la banque renfermant les marqueurs définis ci-dessus et le gène de résistance au RYMV.

Une telle banque BAC est disponible auprès de l'IRRI.

Pour identifier le gène du ou des clones sélectionnés, on procède à l'identification à partir du jus brut de protéines extraites de plantes, de la fraction, puis de proche en proche, de la protéine qui mise en présence de virus purifié permet le mouvement de cellule à cellule dans la variété résistante. La protéine candidate est alors séquencée partiellement soit à partir de l'extrémité N-terminale, soit à partir de fragments internes libérés par hydrolyse. Des amorces peuvent être ainsi définies et sont utilisées pour amplifier l'ADNc correspondant. Aux fins de validation, on vérifie que cet ADNc va obligatoirement aller hybrider le clone BAC identifié dans l'approche cartographique.

En variante, on procède au sous-clonage du fragment BAC contenant le gène en éléments de plus petite taille sous forme de cosmides qui sont ensuite réordonnés de manière à couvrir l'ensemble du clone BAC de départ. Ces cosmides sont utilisés en transformation génétique pour réaliser un test de complémentation fonctionnelle permettant de valider la séquence contenue dans le cosmide et correspondant à l'ADNc isolé par l'approche protéine. Il s'agit en l'occurrence de démontrer que la synthèse de la protéine responsable du mouvement du virus de cellule à cellule permet de rendre sensible la variété résistante.

L'invention vise ainsi un ADNc capable de s'hybrider avec un clone BAC criblé à partir d'une banque constituée comme indiqué ci-dessus de fragments d'ADN de 100 à 150 kb d'une variété de riz telle que IR64, par exemple de  
5 banque BAC (Bacterial Artificial Chromosomes), ce clone BAC appartenant à un contig (ou ensemble de clones BAC chevauchant) de clones BAC renfermant les séquences d'ADN des marqueurs identifiés à partir de riz grâce au procédé défini ci-dessus.

10 Conformément à l'invention, le gène de résistance peut être transféré à des variétés sensibles par voie conventionnelle grâce à l'utilisation de marqueurs génétiques spécifiques qui lui sont liés. Ainsi des variétés résistantes pourront être développées  
15 beaucoup plus facilement et beaucoup plus rapidement.

On notera de plus avec intérêt que la séquence de ce gène facilite l'accès à des gènes de résistance d'autres virus (Potyvirus par exemple) qui sont pathogènes d'autres plantes, mais caractérisés par le  
20 même mécanisme (mouvement de cellule à cellule). L'invention fournit ainsi des moyens de grand intérêt pour l'amélioration des plantes basés sur des résistances naturelles aux pathogènes des végétaux.

D'autres caractéristiques et avantages de  
25 l'invention seront donnés dans les exemples qui suivent, dans lesquels il est fait référence aux figures 1 à 9 qui représentent respectivement

- la figure 1 : le clonage du marqueur M1 dans le plasmide PGEMTeasy. La digestion du plasmide montre un fragment d'ADN de 510 pb correspondant à la bande M1 ;

5           - la figure 2 : l'amplification du marqueur M1 dans les quatre variétés de riz (Azucena, Gigante, IR64 et Tog5681) en utilisant les couples d'amorces  
2-4) : 291 pb ; (2-5) : 310 pb ; (1-3) : 288 pb ;  
(1-4) : 406 pb ; (1-5) : 425 pb ; (2-3). Le fragment M1  
10 est légèrement plus grand chez Tog5681 que chez les autres variétés ;

- la figure 3 : l'identification de sites de restriction sur la séquence du marqueur M1 chez les 4  
15 variétés IR64, Azucena, Gigante et Tog5681 ;

- la figure 4 : la digestion du marqueur M1 avec l'enzyme HpaII après amplification PCR en utilisant les couples d'amorces (1-3), (1-4) et (1-5) sur les  
20 quatre variétés (Azucena, Gigante IR64 et Tog5681). La présence d'un site de restriction HpaII dans les variétés IR64 et Tog5681 libère un fragment de 86 pb qui réduit d'autant la taille du fragment amplifié ;

25           - la figure 5 : la caractérisation du marqueur M1 sur les plantes sensibles et résistantes de la descendance F2 (IR64 x Gigante). Les plantes F2 résistantes ont le profil du parent résistant



(IR64-absence du site HpaII), à l'exception d'un seul recombinant, les plantes résistantes ont le profil du parent sensible (IR64-présence du site HpaII) à l'exception de deux recombinants ;

5

- la figure 6 : la ségrégation du marqueur M1 dans la population HD (IR64 x Azucena) : IR64-Azucena-30 individus HD (IR64 x Azucena) ;

10

- la figure 7 : la carte de liaison génétique du chromosome 4 du riz avec le positionnement du marqueur M1 et l'identification de l'intervalle dans lequel se trouve le locus de résistance ;

15

- la figure 8 : l'hybridation du marqueur M1 utilisé comme sonde sur des membranes portant l'ADN des 4 variétés (IR64, Azucena, Gigante et Tog5681) digérées par 6 enzymes de restriction ApaI, KpnI, PstI, ScaI, HaeIII. La variété Tog5681 présente un profil de restriction différent des autres variétés pour l'enzyme ScaI qui peut être utilisée pour marquer le locus de résistance de cette variété ; et

20

- la figure 9 : l'hybridation du marqueur M1 utilisé comme sonde sur des membranes portant l'ADN d'individus issus de recroisement (IR64 x Tog5681) x Tog5681 et digérés avec l'enzyme ScaI. Cette descendance est en ségrégation pour la résistance au RYMV. Les individus sensibles (5) montrent tous la bande d'IR64 associée à la

25

bande de Tog5681 (individus hétérozygotes). Les individus résistants (9) ne montrent que la bande de Tog5681 à l'exception d'un individu recombinant.

5    Exemple 1 : Identification des variétés sources de résistance

Les variétés utilisées dans l'étude de la résistance et en particulier les deux variétés résistantes Gigante et Tog5681 ont été caractérisées grâce à des marqueurs microsatellites sur un échantillonnage représentatif de loci.

Le polymorphisme se manifeste par le nombre de répétitions d'un court motif nucléotidique, le plus souvent binucléotidique qui est caractéristique d'une variété donnée.

Sur un ensemble de loci, les allèles répertoriés permettent de disposer des caractéristiques spécifiques de chaque variété.

La mise en évidence de ces marqueurs microsatellites s'effectue par l'amplification de l'ADN avec des amorces spécifiques déterminées par Chen et al. (1), suivie d'une migration sur gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes suivant le protocole décrit par les mêmes auteurs.

Le tableau 1 donne les résultats à partir d'un système de référence établi par Chen et al., ci-dessus suivant lequel les allèles sont identifiés par le nombre de répétitions du motif comparativement à la variété IR36

qui sert de témoin. Les deux variétés Gigante et Tog5681 sont ainsi décrites spécifiquement sur 15 loci vis-à-vis de toutes autres variétés (les marqueurs microsatellites sont donnés dans la 1ère colonne).

Tableau 1

Locus	Chr	Taille sur IR 36	référence	IR36	Gigante	IR64	Azucena	TOG 568113
RM001	1	113	(2)	n	n-26	n	n-22	n-26
RM005	1	113	(2)	n	n-6	n-4	n+16	n-8
RM011	7	140	(2)	n	n-4	n	n-24	n-16
RM018	7	157	(2)	n	n+4	n+6	n+8	n-6
RM019	12	226	(2)	n	n	n+21	n-9	n-21
RM021	11	157	(2)	n	n+8	n	n-14	n-32
RM148	3	129	(3)	n	n+6	n	n	n+6
RM167	11	128	(3)	n	n+4	n	n+32	n+24
RM168	3	116	(3)	n	n-20	n	n-20	n-24
RM232	3	158	(1)	n	n-14	n	n-12	n-16
RM022	3	194	(2)	n	n-2	n	n-4	n-2
RM252	4	216	(1)	n	n+38	n+2	n-20	n+10
RM255	4	144	(1)	n	n	n	n	n
RM246	1	116	(1)	n	n-12	n-12	n-16	n-12
RM231	3	182	(1)	n	n+6	n-22	n-4	n-12

### Exemple 2 : Caractérisation de la résistance

5           La résistance a été caractérisée à partir de  
l'inoculation artificielle de jeunes plantules avec du  
virus comparativement à une variété témoin IR64  
extrêmement sensible.

10           Le contenu en virus a été suivi pendant 60  
jours après inoculation grâce à des tests ELISA sur les  
dernières feuilles émises.

Ces tests n'ont jamais pu mettre en évidence de  
signal significativement différent de plantes témoins non  
inoculées par le virus.

15           Une autre expérimentation a été réalisée en  
inoculant des protoplastes isolés des deux variétés  
Tog5681 et Gigante. Dans les deux cas, il possible de  
détecter la présence des protéines virales (protéine de  
la capsid et protéine de mouvement P1), ainsi que  
20           l'accumulation d'ARN viral, qui témoignent de la capacité  
de ces protoplastes à multiplier le virus, et ceci de la  
même manière que les protoplastes de variétés sensibles  
comme IR64.

25           Ainsi, si on considère que la réplication, le  
mouvement de cellule à cellule, et le transport à longue  
distance à travers les vaisseaux, sont les trois étapes  
principales du déroulement du cycle infectieux dans la  
plante, la résistance de ces deux variétés réside le plus

logiquement dans un blocage du virus au niveau des cellules infectées.

Exemple 3 : Génétique de la résistance

5

Différents croisements F1 ont été réalisés entre la variété d'*O. sativa* résistante (Gigante), une variété d'*O. glaberrima* résistante Tog5681 (également identifiée par l'ADRAO) et la variété de référence très

10

sensible IR64 (sélectionnée à l'IRRI).  
La culture du matériel végétal, les croisements et la production des descendances ont été réalisés dans les serres de l'IRD à Montpellier.

15

Les hybrides F1 obtenus entre les variétés sensibles et résistantes ont été testés pour la résistance au virus du RYMV par test ELISA et suivi des symptômes.

20

Ces hybrides F1 se sont tous révélés aussi sensibles que le parent sensible et ont donc montré que la nature de la résistance était récessive.

25

En revanche, les hybrides entre les deux sources de résistance Gigante et Tog5681 n'ont donné que des hybrides F1 résistants en faveur d'un seul et unique locus de résistance chez ces deux sources de résistance.

Ces résultats sont résumés dans le tableau 2 ci-après.

Ce tableau donne la distribution des réponses  
ELISA (A 405 nm) dans les feuilles infectées par voie  
systémique des hybrides F1, des backcross et des  
descendants F2 obtenus à partir des backcross entre la  
5 variété IR64 sensible et les 2 cultivars résistants  
Gigante et Tog5681.

insérer page du Tableau 2



En ce qui concerne Gigante, l'hérédité de la résistance a été confirmée par un test de résistance sur 55 familles F3 du croisement (IR64 x Gigante). Les résultats sont donnés dans le tableau 3.

insérer page du tableau 3

L'examen de ce tableau montre que :

- 5 - 1/4 de plantes F2 ne donne que des plantes résistantes dans les descendances F3, et sont homozygotes pour la résistance
- 1/4 de plantes F2 ne donne que des plantes sensibles dans les descendances F3, et sont homozygotes pour la sensibilité
- 10 - 1/2 des plantes F2 sont en ségrégation pour la résistance et donnent des plantes sensibles et résistantes avec la même proportion (3:1) dans les descendances F3.

15 L'ensemble des résultats s'accorde parfaitement avec un seul gène de résistance récessif présent chez les deux variétés Gigante et Tog5681.

Exemple 4 : Identification des marqueurs de résistance M1 et M2 selon le protocole AFLP

a - Obtention de pools d'ADN

20 Les feuilles de 10 plantes sensibles et de 10 plantes résistantes issues d'une F2 (IR64 x Gigante) ont été prélevées pour extraire leur ADN.

25 Les ADN ont été ensuite mélangés de manière stoechiométrique pour constituer deux pools d'ADN correspondant respectivement à 10 plantes F2 sensibles ou résistantes avec une concentration finale du mélange de 50 ng/ $\mu$ l. Ces mélanges ont servi de base à

l'identification de marqueurs de résistance par la méthode AFLP (Amplified Fragments Length Polymorphism) pour polymorphisme de longueur de fragments amplifiés qui a été développée par Zabeau et al (4), et Vos et al. (5).

5 Les produits utilisés se présentent sous forme d'un kit commercial (Gibco BRL) délivré par Keygene & Life Technologies.

b - Obtention de fragments de restriction

250 ng de chacun des pools d'ADN à 50 ng/ $\mu$ l et des  
10 parents sont digérés simultanément par deux enzymes de restriction (EcoRI et MseI).

Réaction de digestion (25  $\mu$ l) :

5  $\mu$ l d'ADN (50 ng/ml)

15 0,2  $\mu$ l (2 U) de EcoRI (10 U/ $\mu$ l)

0,2  $\mu$ l (2 U) de MseI (5 U/ $\mu$ l)

5  $\mu$ l de tampon T4 ligase 5X

14,5  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O.

La réaction de digestion s'effectue pendant  
20 deux heures à 37°C, puis 15 min. à 70°C pour inactiver les enzymes de restriction. Après digestion, il est procédé à une réaction de ligation.

Réaction de ligation (50  $\mu$ l) :

- 25  $\mu$ l du milieu réactionnel de double digestion
- 1  $\mu$ l d'adaptateur EcoRI
- 1  $\mu$ l d'adaptateur MseI
- 5 5  $\mu$ l de tampon T4 Ligase 5X
- 1  $\mu$ l (1 U) de ligase (10 U/ $\mu$ l)
- 17  $\mu$ l H<sub>2</sub>O.

La réaction de ligation s'effectue à 37°C,  
pendant 3 heures, suivie d'une inactivation de l'enzyme à  
10 60°C pendant 10 min.

c - Amplification

L'amplification proprement dite a été réalisée  
en deux étapes : préamplification et amplification  
spécifique.

15 C1 - Réaction de pré amplification (50  $\mu$ l)

- 5  $\mu$ l du milieu réactionnel renfermant l'ADN  
digéré et fixé aux adaptateurs, dilué au 1/10
- 0,5  $\mu$ l d'amorce EcoRI (150 ng/ $\mu$ l)
- 0,5  $\mu$ l d'amorce MseI (150 ng/ $\mu$ l)
- 20 2  $\mu$ l de mélange de nucléotides 5 mM
- 5  $\mu$ l de tampon 10 X, Promega

5  $\mu$ l de  $MgCl_2$  25 mM

0,2  $\mu$ l (1 U) de Taq polymérase (5 U/ $\mu$ l)

31,8  $\mu$ l de  $H_2O$ .

5 Les caractéristiques de la pré-amplification  
par PCR sont les suivantes :

20 cycles avec dénaturation : 30 sec à 94°C

hybridation : 30 sec à 56°C

élongation : 1 min à 72°C

10 L'amplification sélective se fait à partir d'un aliquote  
de la première amplification diluée au 1/30 en utilisant  
des amorces ayant 3 nucléotides sélectifs à l'extrémité  
3', et en marquant l'une des amorces pour révéler les  
bandes sur un film autoradiographique.

15 On utilise les couples d'amorces suivants :

E-AAC/M-CAG

E-ACC/M-CAG

E-AGC/M-CAG,

dans lesquels

20 E répond à la séquence

GAC TGC GTA CCA ATT C (SEQ ID N°1), et

M à la séquence

GAT GAG TCC TGA GTA A (SEQ ID N° 2).

La température d'hybridation est diminuée de 0,7°C par  
5 cycle, pendant les 11 cycles suivants :

20 derniers cycles dénaturation : 30 sec à 90°C

hybridation : 30 sec à 56°C

élongation : 1 min à 72°C

10 On procède au marquage de l'amorce EcoRI (ramené à  
un tube de 0,5 µl) :

0,18 µl de l'amorce EcoRI (5ng)

0,1 µl de  $\gamma^{33}\text{P}$  ATP (10 mCi/µl)

0,05 µl de tampon kinase 10 X

15 0,02 µl (0,2U) de T4 polymérase kinase (10U/µl)

0,15 µl de H<sub>2</sub>O.

La réaction de marquage se fait à 37°C pendant  
1 heure et est arrêtée par 10 minutes à 70°C.

C2 - Réaction d'amplification spécifique

20 (20 µl) :

0,5  $\mu$ l d'amorce EcoRI marquée

5  $\mu$ l du milieu réactionnel de pré-  
amplification, dilué au 1/30,

0,3  $\mu$ l d'amorce Msel (100 ng/ $\mu$ l)

5 0,8  $\mu$ l de mélange de nucléotides 5 mM

2  $\mu$ l de tampon 10 X Promega

2  $\mu$ l de MgCl<sub>2</sub> 25 mM

0,1  $\mu$ l (0,5 U) de Taq polymérase (5 U/ $\mu$ l)

9,3  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O.

10

Les caractéristiques de l'amplification sont  
les suivantes :

32 cycles avec

. pour le premier cycle :

15 dénaturation : 30 sec à 94°C

hybridation : 30 sec à 65°C

élongation : 1 min à 72°C

. les 11 cycles suivants : les mêmes conditions que  
précédemment, avec diminution à chaque cycle de 0,7°C de  
20 la température d'hybridation ; et pour



. les 20 derniers cycles :

dénaturation : 30 sec à 90°C

hybridation : 30 sec à 56°C

élongation : 1 min à 72°C

5 d - Electrophorèse et Autoradiographie

A la fin de la réaction d'amplification, 20 µl de tampon de charge sont ajoutés (98 % de formamide, 0,005 % de xylène cyanol et 0,005 % de bleu de bromophénol). Les produits d'amplification sont séparés  
10 par électrophorèse sur gel de polyacrylamide dénaturant (6 % d'acrylamide, 8 M d'urée) avec un tampon de migration TBE (Tris 18 mM, EDTA 0,4 mM, acide borique 18 mM, pH 8,0) pendant 3 heures de migration à puissance de 50 watts. Après migration, le gel est fixé dans une  
15 solution 1V d'acide acétique/2V d'éthanol absolu pendant 20 minutes. Le gel est transféré sur un papier Wattman 3M et séché pendant 45 minutes à 80°C avec un sécheur de gel. Le gel est placé dans une cassette avec un film ultrasensible. L'autoradiographie est révélée après deux  
20 jours d'exposition. La comparaison des profils obtenus chez les parents et les pools de plantes sensibles ou résistantes permet d'identifier des bandes présentes dans l'un des pools, mais absentes dans l'autre. Ces bandes candidates au marquage de la résistance sont ensuite  
25 vérifiées individuellement sur chacune des plantes composant les pools d'ADN.

e - Résultats

L'étude des résultats obtenus montre que les deux marqueurs appelés M1 et M2 sont présents chez le parent sensible (IR64) ainsi que dans toutes les plantes F2 (IR64 x Gigante) composant le pool de plantes sensibles, alors que cette bande est absente chez le parent résistant (Gigante) et qu'un seul individu du pool résistant manifeste cette bande. Le même type de variation est observé dans le recroisement (IR64 x Tog5681) x Tog5681. Les autres marqueurs identifiés dans cette analyse (M3 à M6) montrent aussi la même variation:

- présence des bandes chez le parent sensible et le pool des plantes sensibles F2 (IR64 x Gigante) ainsi que les plantes sensibles du recroisement (IR64 x Tog5681) x Tog5681.

- absence de bande chez les parents résistants Gigante et Tog5681, chez le pool des plantes résistantes F2 (IR64 x Gigante) et chez les plantes résistantes du recroisement (IR64 x Tog5681) x Tog5681.

Les données de ségrégation entre les marqueurs AFLP M1 à M6 et le locus de résistance pour les pools F2 (IR64 x Gigante) et le backcross interspécifique (IR64 x Tog5681) x Tog5681 sont résumées dans les tableaux 4 et 5. L'analyse des données de ségrégation et des rares

recombinants observés dans les deux croisements permet d'évaluer les taux de recombinaison entre ces différents marqueurs et le locus de résistance. En particulier, les marqueurs M1 d'une part et les marqueurs M2 à M6 d'autre  
5 part déterminent un segment inférieur à 10-15 cM portant le locus de résistance. M1 et M2 sont ainsi à moins de 5-10 cM et placés de part et d'autre de ce locus.

Résistance / Marqueur M1		Nombre d'individus observés							
Phénotype		Résistant				Sensible			
Génotype résistance RYMV Marqueur AFLP		<i>tt/gg</i> -/-	<i>tt</i> +/-	<i>gg</i> +/+		<i>ll</i> -/-	<i>ll</i> +/-	<i>ll</i> -/-	<i>ll</i> +/+
Pool F2 résistant (IR64 x gigante)		10	-	1		-	-	-	-
Pool F2 sensible (IR64 x gigante)		-	-	-		-	-	0	10
Backcross interspécifique Tog5681		11	1	-		0	3	-	-

Résistance / Marqueur M2, M3, M4, M6		Nombre d'individus observés							
Phénotype		Résistant				Sensible			
Génotype résistance RYMV Marqueur AFLP		<i>tt/gg</i> -/-	<i>tt</i> +/-	<i>gg</i> +/+		<i>ll</i> -/-	<i>ll</i> +/-	<i>ll</i> -/-	<i>ll</i> +/+
Pool F2 résistant (IR64 x gigante)		11	-	0		-	-	-	-
Pool F2 sensible (IR64 x gigante)		-	-	-		-	-	0	10
Backcross interspécifique Tog5681		10	2	-		0	3	-	-

Résistance / Marqueur M5		Nombre d'individus observés							
Phénotype		Résistant				Sensible			
Génotype résistance RYMV Marqueur AFLP		<i>tt/gg</i> -/-	<i>tt</i> +/-	<i>gg</i> +/+		<i>ll</i> -/-	<i>ll</i> +/-	<i>ll</i> -/-	<i>ll</i> +/+
Pool F2 résistant (IR64 x gigante)		11	-	0		-	-	-	-
Pool F2 sensible (IR64 x gigante)		-	-	-		-	-	0	10
Backcross interspécifique Tog5681		9	3	-		0	3	-	-

Tableau 4.5 : Tableaux de contingence entre les marqueurs AFLP M1 à M6 et le locus de résistance pour les pools F2 (IR64 x Gigante) et le back cross interspécifique (IR64 x Tog5681) x Tog5681.

Tableau 4

Marqueur M1/Marqueurs M2, M3, M4, M6 Nombre d'individus observés

Génotype M1	-/+	+/+	-/-	-/-
Génotype M2, M3, M4, M6	-/+	-/-	+/+	-/-
Pool F2 résistant (IR64 x gigante)	0	1	0	10
Pool F2 sensible (IR64 x gigante)	10	0	0	0
Backcross interspécifique Tog5681	11	2	2	11

Marqueur M1/Marqueur M3 Nombre d'individus observés

Génotype M1	-/+	+/+	-/-	-/-
Génotype M3	+/+	-/-	+/+	-/-
Pool F2 résistant (IR64 x gigante)	0	1	0	10
Pool F2 sensible (IR64 x gigante)	10	0	0	0
Backcross interspécifique Tog5681	11	2	3	10

Marqueur M3/Marqueurs M2, M3, M4, M6 Nombre d'individus observés

Génotype M3	-/+	+/+	-/-	-/-
Génotype M2, M3, M4, M6	+/+	-/-	+/+	-/-
Pool F2 résistant (IR64 x gigante)	0	0	0	11
Pool F2 sensible (IR64 x gigante)	10	0	0	0
Backcross interspécifique Tog5681	13	1	0	12

\* (-) backcross interspécifique Tog5681. (- ou -) pool F2

Tableau 4 6. Tableaux de contingence obtenus avec les marqueurs AFLP M1 à M6 dans les pools F (IR64 x Gigante) et le backcross interspécifique (IR64 x Tog5681) x Tog5681.

Tableau 5

Exemple 5 : Isolement du margeur M1

Une nouvelle amplification, avec le même couple d'amorces, a été réalisée, suivie d'une migration sur gel de polyacrylamide dans les mêmes conditions que celles énoncées ci-dessus. La révélation a été faite par une coloration au nitrate d'argent, avec le kit silver staining (Promega), pour visualiser directement les bandes sur le gel. Après révélation, la bande M1 a été excisée du gel, puis l'ADN a été élué dans 50  $\mu$ l d'eau à 4°C pendant une nuit.

Un aliquot de 5  $\mu$ l a été prélevé et réamplifié avec les mêmes couples d'amorces avec un marquage au p<sup>33</sup>.

Le produit d'amplification a été séparé à nouveau sur gel d'acrylamide dénaturant à 6%, et comparé aux parents et aux pools sensibles et résistants. La piste correspondant à ce produit d'amplification montre une seule bande de 510 pb migrant exactement au même niveau que la bande d'origine qui avait été excisée. Un autre aliquot de 5  $\mu$ l a été également amplifié avec les mêmes amorces et a été séparé sur gel d'agarose à 1,8%. La bande correspondant à la taille attendue (510pb) a été à nouveau excisée et purifiée avec un kit gene clean (Promega).

Exemple 6 : Clonage et Séquençage du MarqueurM1

5

. clonage

3  $\mu$ l du produit de purification ont été  
utilisés pour une réaction de clonage pendant une nuit à  
10 37°C.

3  $\mu$ l de produit de purification  
1  $\mu$ l de vecteur PGEMTeasy  
1  $\mu$ l de T4 Tampon ligase 10 X  
15 1  $\mu$ l de T4 DNA Ligase  
4  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O

La transformation a été réalisée avec la souche  
E. Coli JM109 en ajoutant 5  $\mu$ l du produit de clonage à  
20 100  $\mu$ l de cellules compétentes de E. Coli JM109. Une  
préculture a été réalisée sur milieu de culture LB  
pendant 1 heure, à 37 °C. Ensuite les bactéries ont été  
étalées sur boîte de Pétri contenant de l'agar à 1/1000  
d'ampicilline. 50  $\mu$ l d'IPTG-XGal sont ajoutés juste avant  
25 l'étalement des bactéries pour sélectionner les bactéries  
transformées. Une colonie blanche (transformée) a été  
sélectionnée et remise en culture dans les mêmes  
conditions (Agar plus ampicilline).

A partir de cette culture, une mini-préparation d'ADN plasmidique a été réalisée avec le kit Wizard plus (Promega). L'ADN plasmidique contenant l'insert a été digéré avec l'enzyme EcoRI pour vérifier la présence du marqueur M1. Un gel d'agarose à 1,8% a permis de vérifier la présence de la bande de 3 kb correspondant au plasmide et de la bande de 510 pb correspondant au marqueur M1 (photo 1).

#### 10      . Séquençage

La séquence de l'insert (SEQ ID N° 3) est la suivante (5', 3') :

15

SEQ ID N° 3

20            30            40            50            60            70  
 20    GTGCTTGCTTATAGCACTACAGGAGAAGGAAGGGGAACACAACAGCCATGGCGAGCG  
       AAGGTTCAACGTCGGAGAAACAGGCTGCGACGGGCAGCAAGGTGCCGGCGGCGGATC  
       GGAGGAAGGAAAAGGAGGAAATCGAAGTTATGCTGGAGGGGCTTGACCTAAGGGCAG  
       ATGAGGAGGAGGATGTGGAATTGGAGGAAGATCTAGAGGAGCTTGAGGCAGATGCAA  
       GATGGCTAGCCCTAGCCACAGTTCATACGAAGCGATCGTTTAGTCAAGGGGCTTTCT  
       TTGGGAGTATGCGCTCAGCATGGAAGTCCGCGAAAGAAGTAGATTCAGAGCAATGA  
 25    AAGACAATCTGTTCTCGATCCAATTCAATTGTTTGGGGGATTGGGAACGAGTTATGA  
       ATGAAGGTCCATGGACCTTTCGAGGATGTTCCGGTGCTCCTCGCAGAATATGATGGCT  
       GGTCCAAGATTGAAT

30      Les séquences correspondant aux amorces  
 utilisées pour les amplifications AFLP ont été retrouvées  
 et montrent que la bande correspond à un fragment de  
 restriction (EcoRI - MseI).



En déduisant les séquences correspondant aux amorces, la taille réelle du fragment d'ADN de riz cloné est de 471 pb.

5 L'utilisation des différents couples d'amorces (1-3), (1-4), (1-5) d'une part et (2-3), (2-4), (2-5) d'autre part permet de valider le clonage de la bande AFLP M1. L'amplification de l'ADN des variétés utilisées dans les croisements avec ces amorces ne montre qu'une  
10 seule bande. Le fragment correspondant à la variété Tog56581 est un peu plus important que celui des autres variétés (fig. 2).

15 Exemple 7 : Transformation de la séquence M1 en marqueur polymorphe

Un polymorphisme pour le marqueur M1 a été déterminé entre les parents de la population haploïde doublée (IR64 x Azucena). Cette population compte plus de  
20 300 marqueurs répartis sur les 12 chromosomes du riz. Pour cela, on s'est appuyé sur les sites de restriction de la séquence du marqueur M1 déterminée sur le parent IR64 (fig. 3). Les amorces (1-3), (1-4) et (1-5) ont été utilisés pour amplifier l'ADN des parents des croisements  
25 qui a ensuite été digéré par des enzymes de restriction. Le site de restriction HpaII/MspI libère un fragment de 86 pb lorsque l'amorce 1 est utilisée. Ce site est absent chez les variétés Gigante et Azucena. (fig. 4).

Le marqueur a été testé sur les individus F2 du pool sensible et du pool résistant du croisement (IR64 x Gigante). Tous les individus résistants ont le profil de la variété Gigante (absence du marqueur AFLP M1 associée à l'absence du site de restriction HpaII/MspI) à l'exception de l'individu (5.11). Les individus sensibles présentent le site de restriction HpaII/MspI à l'état homozygote comme la variété IR64 à l'exception de deux individus hétérozygotes qui sont recombinés (fig. 5).

La séquence du marqueur M1 que l'on peut amplifier par des amorces spécifiques correspond bien au marqueur AFLP M1. La digestion par l'enzyme HpaII/MspI permet de distinguer l'allèle venant du parent sensible (IR64) du parent résistant (Gigante).

Ces nouvelles données permettent de conforter la position du locus de résistance entre les marqueurs M1 et M2 et d'estimer les taux de recombinaison à  $0,065 \pm 0,045$  pour la distance entre M1 et le locus de résistance et  $0,11 \pm 0,047$  pour la distance entre les marqueurs M1 et M2.

#### Exemple 8 : Cartographie du marqueur M1

Soixante individus de la population (IR 64 x Azucena) ont été passés pour le marqueur M1 :

amplification avec les amorces (1-3) et digestion par l'enzyme HpaII/MspI, suivie d'une séparation des fragments sur un gel d'agarose à 2,5 %. La ségrégation du marqueur M1 est sans distorsion (fig. 6). Les résultats  
5 permettent de cartographier le marqueur M1 en utilisant un logiciel de cartographie (Mapmaker V3), qui permet de placer le marqueur M1 sur le chromosome 4 entre les marqueurs RG 163 et RG 214 (fig. 7). Cet intervalle représente la zone où se situe le locus de résistance au  
10 RYMV.

Exemple 9 : Marquage du locus de résistance de la variété Tog5681

15 La présence du site de restriction HpaII/MspI dans la variété Tog5681 ne permet pas d'utiliser la stratégie de l'exemple 8 pour vérifier que le marqueur M1 est aussi un marqueur de la résistance provenant de Tog5681. Aussi, les 4 variétés Azucena, Gigante, IR64 et  
20 Tog5681 ont été digérées avec 12 enzymes de restriction (BamHI, BglII, DraI, EcoRI, EcoRV, HindIII, ApaI, KpnI, PstI, ScaI, XbaI, HaeIII) pour identifier un polymorphisme de restriction en utilisant la séquence d'ADN du marqueur M1 comme sonde. L'enzyme ScaI permet  
25 d'identifier un polymorphisme entre IR64 et Tog5681 (fig. 8). Ce polymorphisme a été utilisé pour valider le marqueur M1 sur un croisement (IR64 x Tog5681) x IR64 en ségrégation pour la résistance. 5 individus sensibles de ce croisement ont été testés et montrent tous la

bande caractéristique d'IR64. Les 9 individus résistants ne montrent que la bande de Tog5681 à l'exception d'un seul qui est recombinant (fig. 9). Le polymorphisme de restriction mis en évidence par l'enzyme ScaI en utilisant le marqueur M1 comme sonde est donc bien lié au locus de résistance de Tog5681. L'analyse génétique et l'identification de marqueurs de résistance sont cohérentes pour considérer que le marqueur M1 cartographie bien le même locus de résistance chez les deux variétés Gigante et Tog5681.

Exemple 10 : Transfert de la résistance assistée par la marqueur M1.

On notera que pour la validation des marqueurs de résistance en sélection, on utilisera également avantageusement le matériel résultant des croisements d'une variété résistante telle que la variété Gigante avec IR64 afin d'introduire la résistance dans cette variété. Un tel matériel peut correspondre à différents stades de croisement. On dispose par exemple du stade BC2 (87,5% théorique du génome du parent récurrent IR64), mais qui comporte le fragment de chromosome de Gigante portant la résistance au virus. A chaque génération de croisement, la présence du gène a été vérifiée par une évaluation de la ségrégation de la résistance dans la descendance en autofécondation. Le contrôle des marqueurs sur les croisements et leurs descendances permet d'éprouver la valeur prédictive de la résistance par la

présence du fragment de chromosome portant le gène de  
résistance.

Références bibliographiques

(1) Chen, X. et al., (1997), Development of a  
microsatellite framework map providing genome-wide  
5 coverage in rice (*Oryza sativa* L) Theor Appl Genet 95 :  
553-567.

(2) Panaud, O. et al., (1996), Development of  
microsatellite markers and characterization of simple  
10 sequence length polymorphism (SSLP) in rice (*Oryza*  
*sativa* L) Mol Gen Genet 252 : 597-607.

(3) Wu K.S. et al., (1993), Abundance, polymorphism and  
genetic mapping of microsatellites in rice. Mol Gen Genet  
15 241 : 225-235.

(4) Zabeau et al., (1993), Selective restriction fragment  
amplification : a general method for DNA fingerprinting.  
EP 92402629.7.

20

(5) Vos et al., (1995), AFLP, a new technique for DNA  
fingerprinting. Nucleic Acids Research 23: 4407-4414.

## REVENDECATIONS

5

1/ ADNc capable de s'hybrider avec un clone BAC  
criblé à partir d'une banque constituée de fragments  
d'ADN de 100 à 150 kb d'une variété de riz telle que  
IR64, par exemple de banque BAC (Bacterial Artificial  
10 Chromosomes), ce clone BAC appartenant à un contig, ou  
ensemble de clones BAC chevauchant, de clones BAC  
renfermant les séquences d'ADN des marqueurs identifiés à  
partir de riz grâce à un procédé comprenant

- l'amplification sélective de fragments d'ADN  
15 de riz d'une part d'individus résistants, d'autre part  
d'individus sensibles, descendant de variétés parentales,  
ces fragments ayant été préalablement soumis à une étape  
de digestion, puis de ligation pour fixer des adaptateurs  
complémentaires d'amorces ayant, à leur extrémité, un ou  
20 plusieurs nucléotides spécifiques, l'une des amorces du  
couple étant marquée aux fins de révélation,

- la séparation des produits d'amplification,  
par électrophorèse sur gel dans des conditions  
dénaturantes, et

25 - la comparaison des profils d'électrophorèse  
obtenus avec des mélanges de fragments issus de  
descendants résistants et des mélanges issus de  
descendants sensibles, avec les fragments provenant des

variétés parentales, aux fins d'identification de bandes dont le polymorphisme est génétiquement lié au locus de résistance, cette identification étant suivie le cas échéant, à titre de validation, d'une vérification sur  
5 chacun des individus et du calcul du taux de recombinaison génétique entre le marqueur et le locus de résistance.

2/ ADNc selon la revendication 1, caractérisé en ce que lesdites bandes AFLP polymorphes sont  
10 spécifiquement mises en évidence dans une variété sensible au RYMV, et dans la fraction de plantes sensibles issues du croisement de cette variété avec la variété résistante Gigante.

3/ ADNc selon la revendication 1 ou 2, caractérisé en ce que lesdites séquences d'ADN  
15 correspondant auxdites bandes polymorphes, portent le locus de résistance à RYMV et définissent un segment inférieur à 10cm.

4/ ADNc selon la revendication 3, caractérisé en ce que lesdites séquences d'ADN sont des fragments  
20 EcoRI-MseI.

5/ ADNc selon la revendication 4, caractérisé en ce que lesdits fragments ont une taille respectivement, de 510 pb et de 140 pb en gel  
25 d'électrophorèse en conditions dénaturantes.

6/ ADNc selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que lesdits



fragments d'ADN correspondent à des séquences d'ADN  
flanquant le locus de résistance et situés de part et  
d'autre de ce dernier, à 5-10 cM.

5 7/ ADNc selon la revendication 6, caractérisé  
en ce qu'on utilise une séquence d'ADN répondant à SEQ  
ID N° 3.

d'ADN de plantes de riz, et le cas échéant isolées, purifiées et séquencées.

Ces bandes AFLP sont caractérisées en ce qu'elles sont spécifiquement mises en évidence dans une  
5 variété sensible au RYMV (IR64) et dans la fraction de plantes sensibles issues du croisement de cette variété avec la variété résistance Gigante comme décrit dans les exemples.

L'invention vise tout spécialement les  
10 séquences d'ADN correspondant à ces bandes polymorphes, et qui permettent de définir un segment du chromosome 4 de 10-15 cM portant le locus de résistance au RYMV.

Compte tenu de leur procédé d'obtention, les bandes AFLP correspondent à des fragments de restriction  
15 et en particulier, conformément à un mode de réalisation du procédé de l'invention, à des fragments EcoRI - MseI.

Des fragments de ce type sont appelés marqueurs M1 et M2 et sont caractérisés par une taille, respectivement, de 510 pb et de 140 pb en gel  
20 d'électrophorèse en conditions dénaturantes.

Ces fragments sont caractérisés en ce qu'ils correspondent à des séquences d'ADN flanquant le locus de résistance et situés de part et d'autre de ce dernier à 5-10 cM.

L'invention vise un ADNc tel que défini ci-dessus, caractérisé en ce que lesdites séquences d'ADN correspondant auxdites bandes polymorphes, portent le  
25 locus de résistance à RYMV et définissent un segment inférieur à 10cM.

logiquement dans un blocage du virus au niveau des cellules infectées.

Exemple 3 : Génétique de la résistance

5            Différents croisements F1 ont été réalisés entre la variété d'*O. sativa* résistante (Gigante), une variété d'*O. glaberrima* résistante Tog5681 (également identifiée par l'ADRAO) et la variété de référence très sensible IR64 (sélectionnée à l'IRRI).

10           La culture du matériel végétal, les croisements et la production des descendance ont été réalisés dans les serres de l'IRD à Montpellier.

             Les hybrides F1 obtenus entre les variétés sensibles et résistantes ont été testés pour la résistance  
15           au virus du RYMV par test ELISA et suivi des symptômes.

             Ces hybrides F1 se sont tous révélés aussi sensibles que le parent sensible et ont donc montré que la nature de la résistance était récessive.

             En revanche, les hybrides entre les deux sources  
20           de résistance Gigante et Tog5681 n'ont donné que des hybrides F1 résistants en faveur d'un seul et unique locus de résistance chez ces deux sources de résistance.

             Les études ont porté sur la distribution des réponses ELISA (A 405 nm) dans les feuilles infectées par  
25           voie systémique des hybrides F1, des backcross et des descendants F2 obtenus à partir des backcross entre la variété IR64 sensible et les 2 cultivars résistants Gigante et Tog5681.

En ce qui concerne Gigante, l'hérédité de la résistance a été confirmée par un test de résistance sur 55 familles F3 du croisement (IR64 x Gigante).

Les résultats obtenus montrent que :

- 5 - 1/4 de plantes F2 ne donne que des plantes résistantes dans les descendances F3, et sont homozygotes pour la résistance
- 1/4 de plantes F2 ne donne que des plantes sensibles dans les descendances F3, et sont homozygotes pour la sensibilité
- 10 - 1/2 des plantes F2 sont en ségrégation pour la résistance et donnent des plantes sensibles et résistantes avec la même proportion (3:1) dans les descendances F3.

L'ensemble des résultats s'accorde parfaitement avec un  
15 seul gène de résistance récessif présent chez les deux variétés Gigante et Tog5681.

Exemple 4 : Identification des marqueurs de résistance M1 et M2 selon le protocole AFLP

a - Obtention de pools d'ADN

20 Les feuilles de 10 plantes sensibles et de 10 plantes résistantes issues d'une F2 (IR64 x Gigante) ont été prélevées pour extraire leur ADN.

Les ADN ont été ensuite mélangés de manière stoechiométrique pour constituer deux pools d'ADN  
25 correspondant respectivement à 10 plantes F2 sensibles ou résistantes avec une concentration finale du mélange de 50 ng/ $\mu$ l. Ces mélanges ont servi de base à l'identification de marqueurs de résistance par la méthode AFLP (Amplified Fragments Length Polymorphism) pour polymorphisme de  
30 longueur de fragments amplifiés qui a été développée par

Zabeau et al (4), et Vos et al.(5). Les produits utilisés se présentent sous forme d'un kit commercial (Gibco BRL) délivré par Keygene & Life Technologies.

b - Obtention de fragments de restriction

- 5 250 ng de chacun des pools d'ADN à 50 ng/ $\mu$ l et des parents sont digérés simultanément par deux enzymes de restriction (EcoRI et MseI).

Réaction de digestion (25  $\mu$ l) :

- 10 5  $\mu$ l d'ADN (50 ng/ml)  
0,2  $\mu$ l (2 U) de EcoRI (10 U/ $\mu$ l)  
0,2  $\mu$ l (2 U) de MseI (5 U/ $\mu$ l)  
5  $\mu$ l de tampon T4 ligase 5X  
14,5  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O.

- 15 La réaction de digestion s'effectue pendant deux heures à 37°C, puis 15 min. à 70°C pour inactiver les enzymes de restriction. Après digestion, il est procédé à une réaction de ligation.

Réaction de ligation (50  $\mu$ l) :

- 20 25  $\mu$ l du milieu réactionnel de double digestion  
1  $\mu$ l d'adaptateur EcoRI  
1  $\mu$ l d'adaptateur MseI  
5  $\mu$ l de tampon T4 Ligase 5X  
1  $\mu$ l (1 U) de ligase (10 U/ $\mu$ l)  
25 17  $\mu$ l H<sub>2</sub>O.

La réaction de ligation s'effectue à 37°C, pendant 3 heures, suivie d'une inactivation de l'enzyme à 60°C pendant 10 min.

c - Amplification

L'amplification proprement dite a été réalisée en deux étapes : préamplification et amplification spécifique.

C1 - Réaction de pré amplification (50  $\mu$ l)

- 5            5  $\mu$ l du milieu réactionnel renfermant l'ADN digéré et fixé aux adaptateurs, dilué au 1/10
- 0,5  $\mu$ l d'amorce EcoRI (150 ng/ $\mu$ l)
- 0,5  $\mu$ l d'amorce MseI (150 ng/ $\mu$ l)
- 2  $\mu$ l de mélange de nucléotides 5 mM
- 10           5  $\mu$ l de tampon 10 X, Promega
- 5  $\mu$ l de MgCl<sub>2</sub> 25 mM
- 0,2  $\mu$ l (1 U) de Taq polymérase (5 U/ $\mu$ l)
- 31,8  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O.

- 15           Les caractéristiques de la pré-amplification par PCR sont les suivantes :

20 cycles avec            dénaturation : 30 sec à 94°C

                              hybridation : 30 sec à 56°C

                              élongation : 1 min à 72°C

- 20           L'amplification sélective se fait à partir d'un aliquote de la première amplification diluée au 1/30 en utilisant des amorces ayant 3 nucléotides sélectifs à l'extrémité 3', et en marquant l'une des amorces pour révéler les bandes sur un film autoradiographique.

- 25           On utilise les couples d'amorces suivants :

E-AAC/M-CAG

E-ACC/M-CAG

E-AGC/M-CAG,

dans lesquels

- 30           E répond à la séquence

GAC TGC GTA CCA ATT C (SEQ ID N°1), et

M à la séquence

GAT GAG TCC TGA GTA A (SEQ ID N° 2).

La température d'hybridation est diminuée de 0,7°C par

5 cycle, pendant les 11 cycles suivants :

20 derniers cycles dénaturation : 30 sec à 90°C

hybridation : 30 sec à 56°C

élongation : 1 min à 72°C

10 On procède au marquage de l'amorce EcoRI (ramené à un tube de 0,5 µl) :

- 0,18 µl de l'amorce EcoRI (5ng)

0,1 µl de  $\gamma^{33}\text{P}$  ATP (10 mCu/µl)

0,05 µl de tampon kinase 10 X

15 0,02 µl (0,2U) de T4 polymérase kinase (10U/µl)

0,15 µl de H<sub>2</sub>O.

La réaction de marquage se fait à 37°C pendant 1 heure et est arrêtée par 10 minutes à 70°C.

C2 - Réaction d'amplification spécifique

20 (20 µl) :

0,5 µl d'amorce EcoRI marquée

5 µl du milieu réactionnel de pré-amplification, dilué au 1/30,

0,3 µl d'amorce MseI (100 ng/µl)

25 0,8 µl de mélange de nucléotides 5 mM

2 µl de tampon 10 X Promega

2 µl de MgCl<sub>2</sub> 25 mM

0,1 µl (0,5 U) de Taq polymérase (5 U/µl)

9,3  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O.

Les caractéristiques de l'amplification sont les suivantes :

5                    32 cycles avec

. pour le premier cycle :

    dénaturation : 30 sec à 94°C

    hybridation : 30 sec à 65°C

    élongation : 1 min à 72°C

10 . les 11 cycles suivants : les mêmes conditions que  
précédemment, avec diminution à chaque cycle de 0,7°C de la  
température d'hybridation ; et pour

. les 20 derniers cycles :

    dénaturation : 30 sec à 90°C

15                    hybridation : 30 sec à 56°C

    élongation : 1 min à 72°C

d - Electrophorèse et Autoradiographie

A la fin de la réaction d'amplification, 20  $\mu$ l de  
tampon de charge sont ajoutés (98 % de formamide, 0,005 %  
20 de xylène cyanol et 0,005 % de bleu de bromophénol). Les  
produits d'amplification sont séparés par électrophorèse  
sur gel de polyacrylamide dénaturant (6 % d'acrylamide, 8 M  
d'urée) avec un tampon de migration TBE (Tris 18 mM, EDTA  
0,4 mM, acide borique 18 mM, pH 8,0) pendant 3 heures de  
25 migration à puissance de 50 watts. Après migration, le gel  
est fixé dans une solution 1V d'acide acétique/2V d'éthanol  
absolu pendant 20 minutes. Le gel est transféré sur un  
papier Wattman 3M et séché pendant 45 minutes à 80°C avec  
un sécheur de gel. Le gel est placé dans une cassette avec  
30 un film ultrasensible. L'autoradiographie est révélée après



deux jours d'exposition. La comparaison des profils obtenus chez les parents et les pools de plantes sensibles ou résistantes permet d'identifier des bandes présentes dans l'un des pools, mais absentes dans l'autre. Ces bandes candidates au marquage de la résistance sont ensuite vérifiées individuellement sur chacune des plantes composant les pools d'ADN.

#### e - Résultats

L'étude des résultats obtenus montre que les deux marqueurs appelés M1 et M2 sont présents chez le parent sensible (IR64) ainsi que dans toutes les plantes F2 (IR64 x Gigante) composant le pool de plantes sensibles, alors que cette bande est absente chez le parent résistant (Gigante) et qu'un seul individu du pool résistant manifeste cette bande. Le même type de variation est observé dans le recroisement (IR64 x Tog5681) x Tog5681. Les autres marqueurs identifiés dans cette analyse (M3 à M6) montrent aussi la même variation:

- présence des bandes chez le parent sensible et le pool des plantes sensibles F2 (IR64 x Gigante) ainsi que les plantes sensibles du recroisement (IR64 x Tog5681) x Tog5681.

- absence de bande chez les parents résistants Gigante et Tog5681, chez le pool des plantes résistantes F2 (IR64 x Gigante) et chez les plantes résistantes du recroisement (IR64 x Tog5681) x Tog5681.

Les données de ségrégation entre les marqueurs AFLP M1 à M6 et le locus de résistance pour les pools F2 (IR64 x Gigante) et le backcross interspécifique (IR64 x Tog5681) x Tog5681 sont résumées dans les tableaux 4 et 5. L'analyse des données de ségrégation et des rares recombinants observés dans les deux croisements permet d'évaluer les taux de recombinaison entre ces différents marqueurs et le locus de résistance. En particulier, les marqueurs M1 d'une part et les marqueurs M2 à M6 d'autre part déterminent un segment inférieur à 10-15 cM portant le locus de résistance. M1 et M2 sont ainsi à moins de 5-10 cM et placés de part et d'autre de ce locus.

Résistance / Marqueur M1	Nombre d'individus observés							
	Résistant				Sensible			
Phénotype								
Génotype résistance RYMV	1133	11	33	11	11	11	11	11
Marqueur AFLP	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+
Pool F2 résistant (IR64 x gigante)	10	.	1	.	.	.	.	.
Pool F2 sensible (IR64 x gigante)	.	.	.	.	.	0	10	.
Backcross interspécifique Tog3631	11	1	.	0	3	.	.	.

Résistance / Marqueur M2, M3, M4, M6	Nombre d'individus observés							
	Résistant				Sensible			
Phénotype								
Génotype résistance RYMV	1122	11	22	11	11	11	11	11
Marqueur AFLP	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+
Pool F2 résistant (IR64 x gigante)	11	.	0	.	.	.	.	.
Pool F2 sensible (IR64 x gigante)	.	.	.	.	.	0	10	.
Backcross interspécifique Tog3631	10	2	.	0	3	.	.	.

Résistance / Marqueur M5	Nombre d'individus observés							
	Résistant				Sensible			
Phénotype								
Génotype résistance RYMV	1133	11	33	11	11	11	11	11
Marqueur AFLP	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+
Pool F2 résistant (IR64 x gigante)	11	.	0	.	.	.	.	.
Pool F2 sensible (IR64 x gigante)	.	.	.	.	.	0	10	.
Backcross interspécifique Tog3631	9	3	.	0	3	.	.	.

Tableau 4.5 : Tableaux de contingence entre les marqueurs AFLP M1 à M6 et le locus de résistance pour les pools F2 (IR64 x Gigante) et le back cross interspécifique (IR64 x Tog3631) x Tog3631.

Tableau 2

Marqueur M1/Marqueurs M2, M3, M4, M6 Nombre d'individus observés

Génotype M1	-*	-*	+	+
Génotype M2, M3, M4, M6	-*	+	-*	+
Pool F2 résistant (IR64 x gigante)	0	1	0	10
Pool F2 sensible (IR64 x gigante)	10	0	0	0
Backcross interspécifique Tog5631	11	2	2	11

Marqueur M1/Marqueur M3 Nombre d'individus observés

Génotype M1	-*	-*	+	+
Génotype M3	-*	+	-*	+
Pool F2 résistant (IR64 x gigante)	0	1	0	10
Pool F2 sensible (IR64 x gigante)	10	0	0	0
Backcross interspécifique Tog5631	11	2	2	10

Marqueur M3/Marqueurs M2, M3, M4, M6 Nombre d'individus observés

Génotype M3	-*	-*	+	+
Génotype M2, M3, M4, M6	-*	+	-*	+
Pool F2 résistant (IR64 x gigante)	0	0	0	11
Pool F2 sensible (IR64 x gigante)	10	0	0	0
Backcross interspécifique Tog5631	13	1	0	12

\* (-) backcross interspécifique Tog5631, (+) pool F2

Tableau 4 6 Tableaux de contingence obtenus avec les marqueurs AFLP M1 à M6 dans les pools F (IR64 x Gigante) et le backcross interspécifique (IR64 x Tog5631) x Tog5631

Tableau 3

Exemple 5 : Isolement du marqueur M1

Une nouvelle amplification, avec le même couple d'amorces, a été réalisée, suivie d'une migration sur gel de polyacrylamide dans les mêmes conditions que celles énoncées ci-dessus. La révélation a été faite par une coloration au nitrate d'argent, avec le kit silver staining (Promega), pour visualiser directement les bandes sur le gel. Après révélation, la bande M1 a été excisée du gel, puis l'ADN a été élué dans 50  $\mu$ l d'eau à 4°C pendant une nuit.

Un aliquot de 5  $\mu$ l a été prélevé et réamplifié avec les mêmes couples d'amorces avec un marquage au p<sup>33</sup>.

Le produit d'amplification a été séparé à nouveau sur gel d'acrylamide dénaturant à 6%, et comparé aux parents et aux pools sensibles et résistants. La piste correspondant à ce produit d'amplification montre une seule bande de 510 pb migrant exactement au même niveau que la bande d'origine qui avait été excisée. Un autre aliquot de 5  $\mu$ l a été également amplifié avec les mêmes amorces et a été séparé sur gel d'agarose à 1,8%. La bande correspondant à la taille attendue (510pb) a été à nouveau excisée et purifiée avec un kit gene clean (Promega).

25

Exemple 6 : Clonage et Séquençage du Marqueur M1. clonage

3  $\mu$ l du produit de purification ont été utilisés pour une réaction de clonage pendant une nuit à 37°C.

- 3  $\mu$ l de produit de purification
- 5 1  $\mu$ l de vecteur PGEMTeasy
- 1  $\mu$ l de T4 Tampon ligase 10 X
- 1  $\mu$ l de T4 DNA Ligase
- 4  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O

10 La transformation a été réalisée avec la souche *E. Coli* JM109 en ajoutant 5  $\mu$ l du produit de clonage à 100  $\mu$ l de cellules compétentes de *E. Coli* JM109. Une préculture a été réalisée sur milieu de culture LB pendant 1 heure, à 37 °C. Ensuite les bactéries ont été étalées sur boîte de Pétri contenant de l'agar à 1/1000 d'ampicilline. 50  $\mu$ l d'IPTG-XGal sont ajoutés juste avant l'étalement des bactéries pour sélectionner les bactéries transformées. Une colonie blanche (transformée) a été sélectionnée et remise en culture dans les mêmes conditions (Agar plus  
15 ampicilline).

20 A partir de cette culture, une mini-préparation d'ADN plasmidique a été réalisée avec le kit Wizard plus (Promega). L'ADN plasmidique contenant l'insert a été digéré avec l'enzyme EcoRI pour vérifier la présence du marqueur M1. Un gel d'agarose à 1,8% a permis de vérifier  
25 la présence de la bande de 3 kb correspondant au plasmide et de la bande de 510 pb correspondant au marqueur M1 (photo 1).

La séquence de l'insert (SEQ ID N° 3) est la suivante (5', 3') :

5 SEQ ID N° 3

20 30 40 50 60 70  
 GTGCTTGCTTATAGCACTACAGGAGAAGGAAGGGGAACACAACAGCCATGGCGAGCGAA  
 GGTTCAACGTCGGAGAAACAGGCTGCGACGGGCAGCAAGGTGCCGGCGGCGGATCGGAG  
 10 GAAGGAAAAGGAGGAAATCGAAGTTATGCTGGAGGGGCTTGACCTAAGGGCAGATGAGG  
 AGGAGGATGTGGAATTGGAGGAAGATCTAGAGGAGCTTGAGGCAGATGCAAGATGGCTA  
 GCCCTAGCCACAGTTCATACGAAGCGATCGTTTAGTCAAGGGGCTTTCTTTGGGAGTAT  
 GCGCTCAGCATGGAACCTGCGCGAAAGAAGTAGATTTCAGAGCAATGAAAGACAATCTGT  
 TCTCGATCCAATTCAATTGTTTGGGGGATTGGGAACGAGTTATGAATGAAGGTCCATGG  
 15 ACCTTTTCGAGGATGTTTCGGTGCTCCTCGCAGAATATGATGGCTGGTCCAAGATTGAAT

Les séquences correspondant aux amorces utilisées pour les amplifications AFLP ont été retrouvées et montrent que la bande correspond à un fragment de restriction (EcoRI - MseI).

En déduisant les séquences correspondant aux amorces, la taille réelle du fragment d'ADN de riz cloné est de 471 pb.

L'utilisation des différents couples d'amorces (1-3), (1-4), (1-5) d'une part et (2-3), (2-4), (2-5) d'autre part permet de valider le clonage de la bande AFLP M1. L'amplification de l'ADN des variétés utilisées dans les croisements avec ces amorces ne montre qu'une seule bande. Le fragment correspondant à la variété Tog56581 est un peu plus important que celui des autres variétés (fig. 2).

Exemple 7 : Transformation de la séquence M1 en  
marqueur polymorphe

Un polymorphisme pour le marqueur M1 a été  
5 déterminé entre les parents de la population haploïde  
doublée (IR64 x Azucena). Cette population compte plus de  
300 marqueurs répartis sur les 12 chromosomes du riz. Pour  
cela, on s'est appuyé sur les sites de restriction de la  
séquence du marqueur M1 déterminée sur le parent IR64 (fig.  
10 3). Les amorces (1-3), (1-4) et (1-5) ont été utilisés pour  
amplifier l'ADN des parents des croisements qui a ensuite  
été digéré par des enzymes de restriction. Le site de  
restriction HpaII/MspI libère un fragment de 86 pb lorsque  
l'amorce 1 est utilisée. Ce site est absent chez les  
15 variétés Gigante et Azucena. (fig. 4).

Le marqueur a été testé sur les individus F2 du  
pool sensible et du pool résistant du croisement (IR64 x  
Gigante). Tous les individus résistants ont le profil de la  
variété Gigante (absence du marqueur AFLP M1 associée à  
20 l'absence du site de restriction HpaII/MspI) à l'exception  
de l'individu (5.11). Les individus sensibles présentent le  
site de restriction HpaII/MspI à l'état homozygote comme la  
variété IR64 à l'exception de deux individus hétérozygotes  
qui sont recombinés (fig. 5).

25 La séquence du marqueur M1 que l'on peut  
amplifier par des amorces spécifiques correspond bien au  
marqueur AFLP M1. La digestion par l'enzyme HpaII/MspI  
permet de distinguer l'allèle venant du parent sensible  
(IR64) du parent résistant (Gigante).



Ces nouvelles données permettent de conforter la position du locus de résistance entre les marqueurs M1 et M2 et d'estimer les taux de recombinaison à  $0,065 \pm 0,045$  pour la distance entre M1 et le locus de résistance et  $0,11 \pm 0,047$  pour la distance entre les marqueurs M1 et M2.

#### Exemple 8 : Cartographie du marqueur M1

Soixante individus de la population (IR 64 x Azucena) ont été passés pour le marqueur M1 : amplification avec les amorces (1-3) et digestion par l'enzyme HpaII/MspI, suivie d'une séparation des fragments sur un gel d'agarose à 2,5 %. La ségrégation du marqueur M1 est sans distorsion (fig. 6). Les résultats permettent de cartographier le marqueur M1 en utilisant un logiciel de cartographie (Mapmaker V3), qui permet de placer le marqueur M1 sur le chromosome 4 entre les marqueurs RG 163 et RG 214 (fig. 7). Cet intervalle représente la zone où se situe le locus de résistance au RYMV.

#### Exemple 9 : Marquage du locus de résistance de la variété Tog5681

La présence du site de restriction HpaII/MspI dans la variété Tog5681 ne permet pas d'utiliser la stratégie de l'exemple 8 pour vérifier que le marqueur M1 est aussi un marqueur de la résistance provenant de Tog5681. Aussi, les 4 variétés Azucena, Gigante, IR64 et

Tog5681 ont été digérées avec 12 enzymes de restriction (BamHI, BglII, DraI, EcoRI, EcoRV, HindIII, ApaI, KpnI, PstI, ScaI, XbaI, HaeIII) pour identifier un polymorphisme de restriction en utilisant la séquence d'ADN du marqueur M1 comme sonde. L'enzyme ScaI permet d'identifier un polymorphisme entre IR64 et Tog5681 (fig. 8). Ce polymorphisme a été utilisé pour valider le marqueur M1 sur un recroisement (IR64 x Tog5681) x IR64 en ségrégation pour la résistance. 5 individus sensibles de ce recroisement ont été testés et montrent tous la bande caractéristique d'IR64. Les 9 individus résistants ne montrent que la bande de Tog5681 à l'exception d'un seul qui est recombinant (fig. 9). Le polymorphisme de restriction mis en évidence par l'enzyme ScaI en utilisant le marqueur M1 comme sonde est donc bien lié au locus de résistance de Tog5681. L'analyse génétique et l'identification de marqueurs de résistance sont cohérentes pour considérer que le marqueur M1 cartographie bien le même locus de résistance chez les deux variétés Gigante et Tog5681.

Exemple 10 : Transfert de la résistance assistée par la marqueur M1.

On notera que pour la validation des marqueurs de résistance en sélection, on utilisera également avantageusement le matériel résultant des recroisements d'une variété résistante telle que la variété Gigante avec IR64 afin d'introduire la résistance dans cette variété. Un tel matériel peut correspondre à différents stades de recroisement. On dispose par exemple du stade BC2 (87,5% théorique du génome du parent récurrent IR64), mais qui comporte le fragment de chromosome de Gigante portant la

résistance au virus. A chaque génération de recroisement, la présence du gène a été vérifiée par une évaluation de la ségrégation de la résistance dans la descendance en autofécondation. Le contrôle des marqueurs sur les  
5 recroisements et leurs descendances permet d'éprouver la valeur prédictive de la résistance par la présence du fragment de chromosome portant le gène de résistance.

Références bibliographiques

- 5 (1) Chen, X. et al., (1997), Development of a  
microsatellite framework map providing genome-wide coverage  
in rice (*Oryza sativa* L) *Theor Appl Genet* 95 : 553-567.
- 10 (2) Panaud, O. et al., (1996), Development of  
microsatellite markers and characterization of simple  
sequence length polymorphism (SSLP) in rice (*Oryza*  
*sativa* L) *Mol Gen Genet* 252 : 597-607.
- 15 (3) Wu K.S. et al., (1993), Abundance, polymorphism and  
genetic mapping of microsatellites in rice. *Mol Gen Genet*  
241 : 225-235.
- (4) Zabeau et al., (1993), Selective restriction fragment  
amplification : a general method for DNA fingerprinting. *EP*  
92402629.7.
- 20 (5) Vos et al., (1995), AFLP, a new technique for DNA  
fingerprinting. *Nucleic Acids Research* 23: 4407-4414.

## REVENDEICATIONS

5

1/ ADNc capable de s'hybrider avec un clone BAC  
criblé à partir d'une banque constituée de fragments d'ADN  
de 100 à 150 kb d'une variété de riz telle que IR64, par  
exemple de banque BAC (Bacterial Artificial Chromosomes),  
10 ce clone BAC appartenant à un contig, ou ensemble de clones  
BAC chevauchant, de clones BAC renfermant les séquences  
d'ADN des marqueurs identifiés à partir de riz grâce à un  
procédé comprenant

- l'amplification sélective de fragments d'ADN de  
15 riz d'une part d'individus résistants, d'autre part  
d'individus sensibles, descendant de variétés parentales,  
ces fragments ayant été préalablement soumis à une étape de  
digestion, puis de ligation pour fixer des adaptateurs  
complémentaires d' amorces ayant, à leur extrémité, un ou  
20 plusieurs nucléotides spécifiques, l'une des amorces du  
couple étant marquée aux fins de révélation,

- la séparation des produits d'amplification, par  
électrophorèse sur gel dans des conditions dénaturantes, et

- la comparaison des profils d'électrophorèse  
25 obtenus avec des mélanges de fragments issus de descendants  
résistants et des mélanges issus de descendants sensibles,  
avec les fragments provenant des variétés parentales, aux

fins d'identification de bandes dont le polymorphisme est génétiquement lié au locus de résistance, cette identification étant suivie le cas échéant, à titre de validation, d'une vérification sur chacun des individus et du calcul du taux de recombinaison génétique entre le marqueur et le locus de résistance.

2/ ADNc selon la revendication 1, caractérisé en ce que lesdites bandes AFLP polymorphes sont spécifiquement mises en évidence dans une variété sensible au RYMV, et dans la fraction de plantes sensibles issues du croisement de cette variété avec la variété résistante Gigante.

3/ ADNc selon la revendication 1 ou 2, caractérisé en ce que lesdites séquences d'ADN correspondant auxdites bandes polymorphes, portent le locus de résistance à RYMV et définissent un segment inférieur à 10cM.

4/ ADNc selon la revendication 3, caractérisé en ce que lesdites séquences d'ADN sont des fragments EcoRI-MseI.

5/ ADNc selon la revendication 4, caractérisé en ce que lesdits fragments ont une taille respectivement, de 510 pb et de 140 pb en gel d'électrophorèse en conditions dénaturantes.

6/ ADNc selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que lesdits fragments d'ADN correspondent à des séquences d'ADN flanquant le locus de résistance et situés de part et d'autre de ce dernier, à 5-10 cM.

7/ ADNc selon la revendication 6, caractérisé en  
ce qu'on utilise une séquence d'ADN répondant à SEQ ID N°  
3.

## LISTE DE SEQUENCES

&lt;110&gt; I.R.D.

<120> MOYENS POUR L'IDENTIFICATION DU LOCUS D'UN GENE MAJEUR  
DE LA RESISTANCE AU VIRUS DE LA PANACHURE JAUNE DU RIZ  
ET LEURS APPLICATIONS.

&lt;130&gt; CP/VB 968

&lt;140&gt;

&lt;141&gt;

&lt;160&gt; 8

&lt;170&gt; PatentIn Ver. 2.1

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 16

&lt;212&gt; ADN

&lt;213&gt; nucléotide

&lt;400&gt; 1

gactgcgatc caattc

16

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 16

&lt;212&gt; ADN

&lt;213&gt; nucléotide

&lt;400&gt; 2

gatgagtcct gagtaa

16

&lt;210&gt; 3

&lt;211&gt; 471

&lt;212&gt; ADN

&lt;213&gt; nucléotide

&lt;400&gt; 3

gtgcttgctt atagcactac aggagaagga aggggaacac aacagccatg gcgagcgaag 60  
gttcaacgtc ggagaaacag gctgcgacgg gcagcaaggt gccggcggcg gatcgaggga 120  
aggaaaagga ggaaatcgaa gttatgctgg aggggcttga cctaagggca gatgaggagg 180  
aggatgtgga attggaggaa gatctagagg agcttgaggc agatgcaaga tggctagccc 240  
tagccacagt tcatacgaag cgatcggtta gtcaaggggc tttctttggg agtatgcgct 300  
cagcatggaa ctgcgcgaaa gaagtagatt tcagagcaat gaaagacaat ctgttctcga 360  
tccaattcaa ttgtttgggg gattgggaac gagttatgaa tgaaggtcca tggacctttc 420  
gaggatgttc ggtgctcctc gcagaatatg atggctggtc caagattgaa t 471

&lt;210&gt; 4

&lt;211&gt; 21

&lt;212&gt; ADN

&lt;213&gt; nucléotide

&lt;400&gt; 4

aggaagggga acacaacagc c

21

&lt;210&gt; 5

&lt;211&gt; 21

&lt;212&gt; ADN

&lt;213&gt; nucléotide



<400> 5  
ttatgctgga ggggcttgac c

21

<210> 6  
<211> 21  
<212> ADN  
<213> nucléotide

<400> 6  
gcagttccat gctgagcgca t

21

<210> 7  
<211> 21  
<212> ADN  
<213> nucléotide

<400> 7  
ccgaacatcc tcgaaaggtc c

21

<210> 8  
<211> 21  
<212> ADN  
<213> nucléotide

<400> 8  
tcatattctg cgaggagcac c

21

1/7

Figure 1

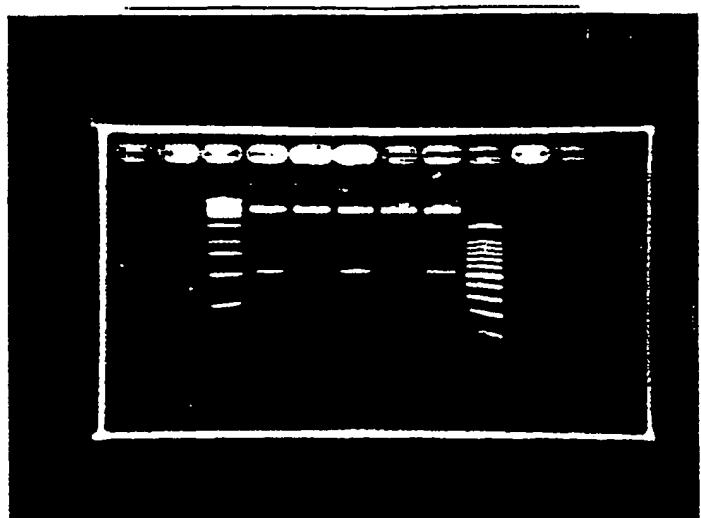
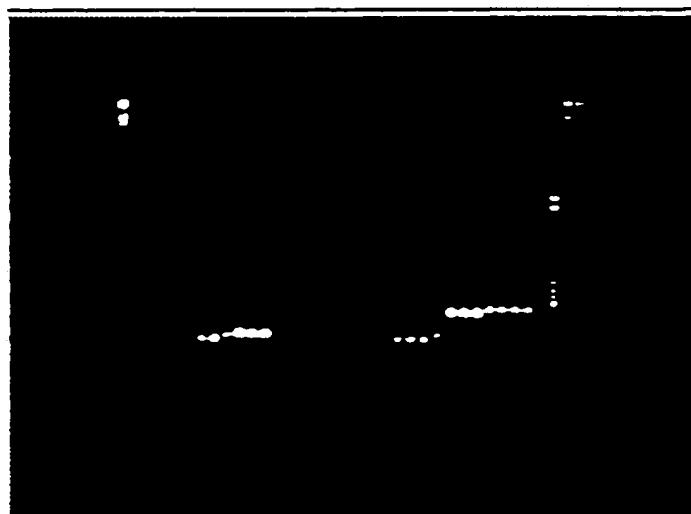
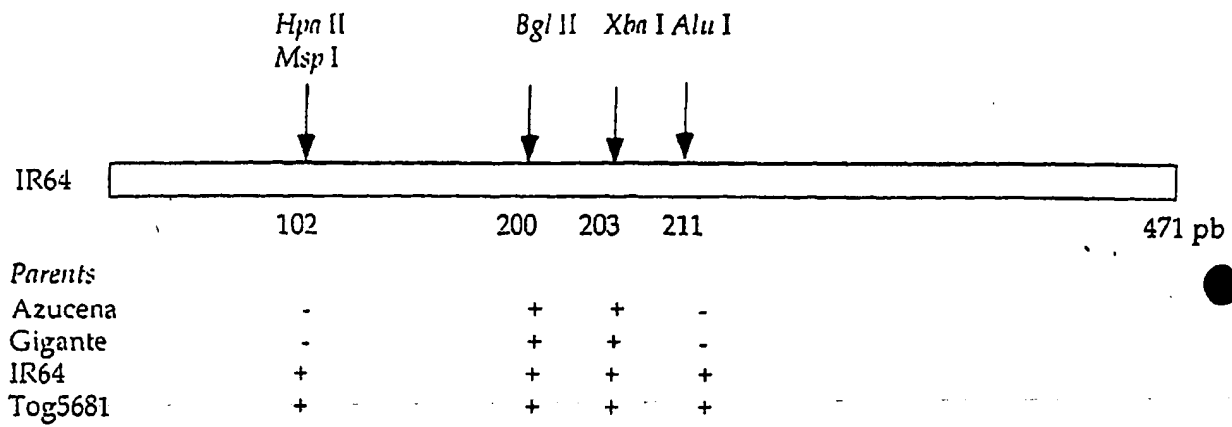


Figure 2



**Figure 3**

3/7

Figure 4

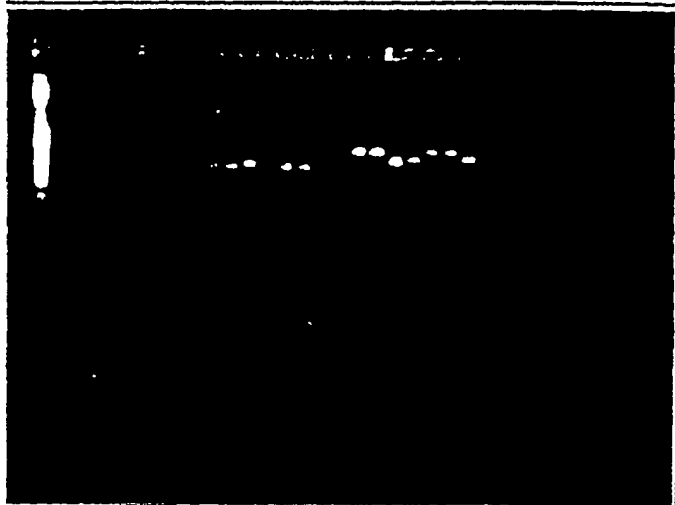
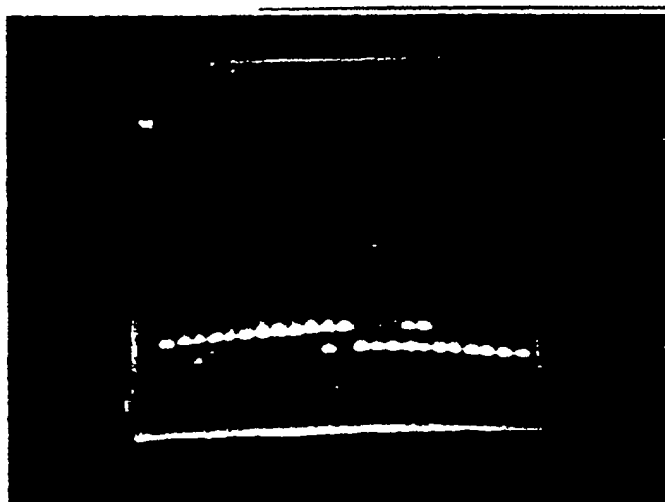
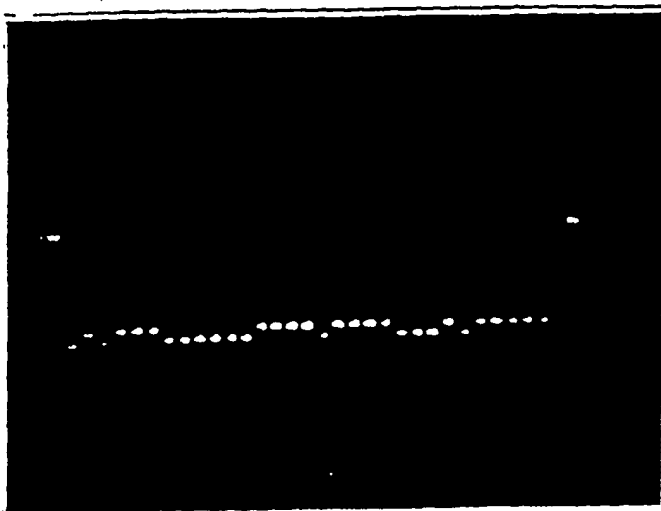


Figure 5



4/7

Figure 6



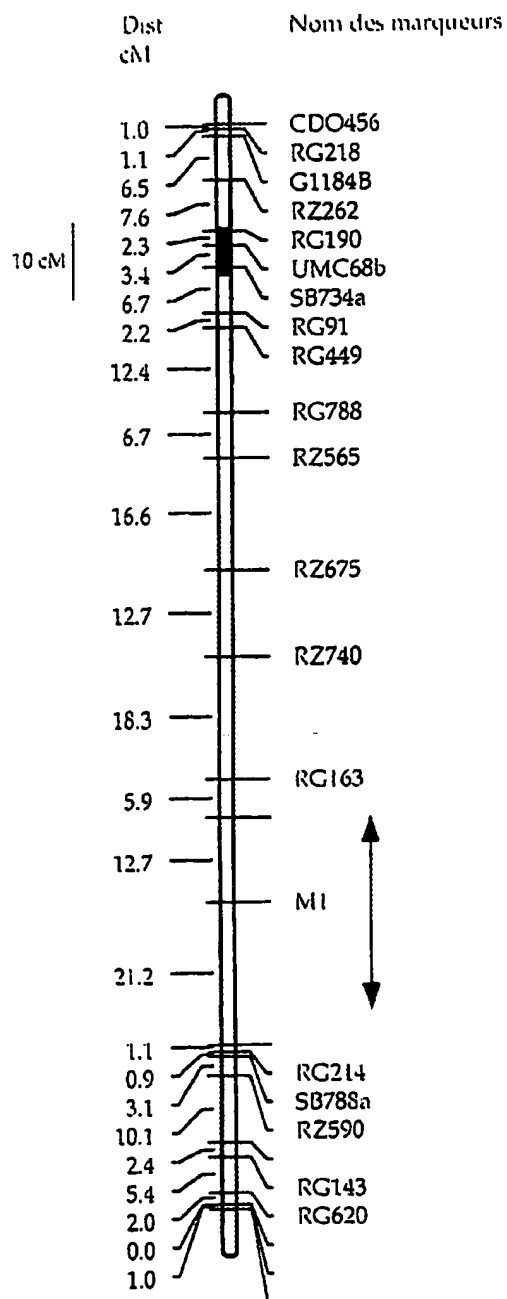
**Figure 7**

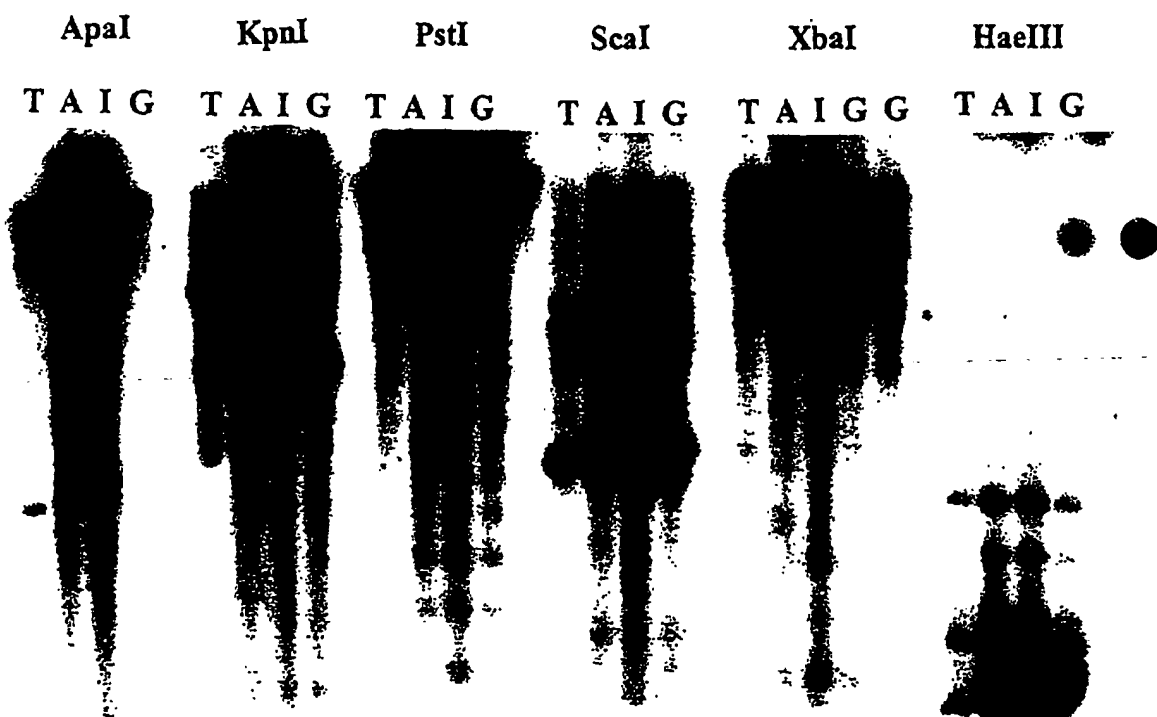
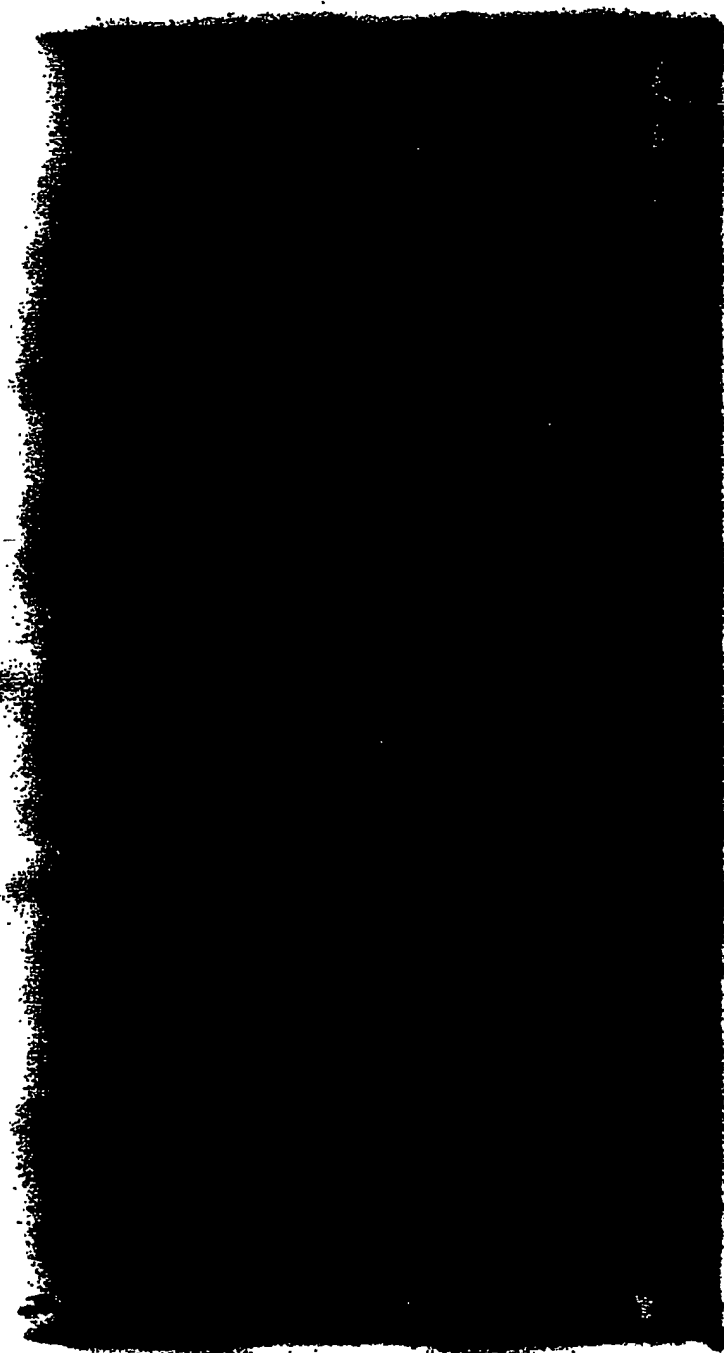
Figure 8

Figure 9





**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

☐ BLACK BORDERS

☒ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES

☐ FADED TEXT OR DRAWING

☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING

☐ SKEWED/SLANTED IMAGES

☒ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS

☐ GRAY SCALE DOCUMENTS

☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT

☒ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY

☐ OTHER: \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**